

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lana Mišić

6866/BT

**UČINCI PROTEINSKIH HIDROLIZATA IZ POGAČE KONOPLJE NA
PROLIFERACIJU TUMORSKE STANIČNE LINIJE HeLa**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Učinci proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na proliferaciju tumorske
stanične linije HeLa**

Lana Mišić, 0058204505

Sažetak: Bioaktivni peptidi su prirodne kemijske tvari koje se nalaze u biljkama i životinjama te pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje. Zbog visoke specifičnosti i afiniteta za tkivo te pozitivnog učinka na zdravlje, postaju sve zanimljiviji izbor za znanstvena istraživanja, a oslobađaju se tijekom enzimske proteolize proteina (gastrointestinalna digestija ili *in vitro* hidroliza proteolitičkim enzimima). Hidrolizat proteina iz pogače konoplje pokazao je, u brojnim znanstvenim istraživanjima, da posjeduje multifunkcionalne bioaktivne peptide, primjerice WVYY i PSLPA koji pokazuju antioksidacijski i antihipertenzivni učinak. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak hidrolizata proteina iz pogače konoplje, dobivenog djelovanjem s enzimom alkalazom, na proliferaciju HeLa stanica (stanice raka vrata maternice) MTS metodom. Hidrolizom enzimom alkalazom dobiven je ishodni hidrolizat koji sadrži peptide različitih veličina te je ultrafiltracijom odvojena frakcija koja je sadržavala peptide manje od 3 kDa. Ishodni hidrolizat (s peptidima različitih veličina) pri koncentraciji proteina od 5 mg/mL, pokazao je snažno inhibitorno djelovanje na HeLa stanice uz preživljenje od 29,4 %. Hidrolizat s koncentracijom od 1 mg/mL pokazao je blago inhibitorno djelovanje, uz preživljenje stanica od 86,03%. Istovremeno, frakcija hidrolizata s peptidima manjim od 3 kDa, pri svim ispitanim koncentracijama, nije pokazala inhibicijsko djelovanje. Za širu sliku djelovanja proteinskih hidrolizata i njihovih frakcija potrebno je napraviti dodatna istraživanja, kako na HeLa stanicama, tako i na drugim tumorskim stanicama.

Ključne riječi: bioaktivni peptidi, HeLa stanice, pogača konoplje, proteinski hidrolizat

Rad sadrži: 25 stranica, 3 slike, 15 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag. ing.

Datum obrane: 19. rujan 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effect of hemp seed protein hydrolysates on the tumour cell line HeLa proliferation

Lana Mišić, 6866/BT

Abstract: Bioactive peptides are natural chemical substances found in plants and animals which have positive impact on human health. Because of its high specificity and affinity for tissue and positive impact on health, they become more interesting choice for scientific research and they are released during enzymatic proteolysis of proteins (gastrointestinal digestion or *in vitro* hydrolysis with proteolytic enzymes). Hemp seed protein hydrolysates has shown, in many scientific researches, that owns multifunctional bioactive peptides, for example WVYY and PSLPA which have shown antioxidant and antihypertensive effect. The aim of this work was to assay the effect of hemp seed protein hydrolysate, obtained by proteolytic enzyme alcalase, on proliferation of HeLa cells (cervical cancer cells) using MTS method. By alcalase proteolysis we got initial hydrolysate which contained peptides various sizes and by ultrafiltration was separated fraction that contained only peptides smaller than 3 kDa. Initial protein hydrolysate with protein concentration of 5 mg/mL has shown strong inhibitory effect on HeLa cells with survival of 29,4%. Weaker inhibition showed initial hydrolysate with protein concentration of 1 mg/mL with cell survival of 86,03%. At the same time, hydrolysate fraction with peptides smaller than 3 kDa, in all concentrations, did not show inhibitory effect. For a wider picture of protein hydrolysate and its fractions effect, it is necessary to do many more *in vitro* researches, with HeLa and other cancer cells.

Keywords: bioactive peptides, HeLa cells, hemp seed, protein hydrolysate

Thesis contains: 25 pages, 3 figures, 15 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Višnja Gaurina Srček, Ph.D. Full Professor

Technical support and assistance: Marijan Logarušić, M.Eng.

Defence date: September 19th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA	3
2.1.1. Uvjeti (zahtjevi) za uzgoj kulture životinjskih stanica	4
2.1.2. HeLa stanična linija	7
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI	9
2.2.1. Sjeme konoplje	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. HeLa stanična linija	12
3.1.2. Hidrolizat iz pogače konoplje	12
3.1.3. Kemikalije	12
3.1.4. Otopine i puferi	12
3.1.5. Uređaji i oprema	13
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. Uzgoj HeLa stanica	13
3.2.1.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	14
3.2.1.2. Glukoza test (GOD PAP)	14
3.2.2. Određivanje učinka proteinskih hidrolizata konoplje na vijabilnost HeLa stanica	
3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryu	15
3.2.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom	16
4. REZULTATI	17
4.1. Praćenje kinetike rasta HeLa stanica i potrošnje supstrata (glukoze) u podlozi	17

4.1.1. Kinetika rasta HeLa stanica	17
4.1.2. Brzina potrošnje supstrata (glukoze) u podlozi	18
4.2. Učinak proteinskih hidrolizata konoplje na vijabilnost HeLa stanica	19
4.2.1. Početna koncentracija proteina u hidrolizatu konoplje	19
4.2.2. Učinak proteinskih hidrolizata konoplje različitih koncentracija na vijabilnost HeLa stanica	19
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČCI	23
7. LITERATURA	24

1. UVOD

Biljke su od davnina poznate kao najpouzdaniji izvor terapijskih lijekova, o čemu govori i činjenica da 25% svih poznatih lijekova dolazi od biljaka. Između ostalog, biljke su bogat izvor raznovrsnih proteina koji služe kao sirovina za proizvodnju bioaktivnih peptida (Rabbi, 2017). Bioaktivni peptidi su spojevi koji su aktivni unutar živog organizma, tkiva ili stanice. Oni su poznati po visokoj specifičnosti i afinitetu za tkivo te učinkovitosti u promicanju zdravlja. Zdravstvena primjena uključuje zaštitu od oksidativnog stresa, utjecaj na imunološki sustav, smanjenje krvnog tlaka i inhibiciju pretjerane stanične proliferacije. Zbog toga se istraživanja i pronalazak bioaktivnih peptida iz prirodnih izvora povećava eksponencijalno (Aluko, 2017).

Konoplja (*Cannabis sativa L.*) je vjerojatno čovjekov najstariji višenamjenski usjev koji se kultivira već 6000 godina, a služi kao izvor hrane, vlakana i lijekova. Sjeme konoplje je jedan od najboljih izvora proteina koji sadrže svih 9 esencijalnih aminokiselina (Garcia, 2017). Hidrolizat proteina iz sjemena konoplje pokazao je, u prethodnim istraživanjima, posjedovanje antioksidativnih svojstava. Antioksidativni peptidi su predmet istraživanja zbog potencijalnog doprinosa ljudskom zdravlju i liječenju tj. prevenciji kroničnih bolesti. Prisutnost bioaktivnih komponenti u proteinima iz sjemena konoplje, znatno su povećali njenu primjenu u proizvodnji funkcionalne hrane i nutraceutika kao i broj proizvoda od sjemena konoplje na tržištu.

Kultura životinjskih stanica podrazumijeva rast stanica izvan organizma tj. uzgoj stanica pod kontroliranim uvjetima, izvan biološkog okruženja. Ona se odnosi na rast eukariotskih stanica *in vitro*, u mediju za uzgoj koji sadrži sve tvari potrebne za rast (nutrijenti, faktori rasta, plinovi...) (Khanal, 2017). Kultura stanica ima brojne primjene u medicini i znanstvenim istraživanjima, pri čemu su posebno zanimljive humane tumorske stanične linije koje se često koriste u *in vitro* testovima citotoksičnosti koji predstavljaju prvi korak u ispitivanju biološke aktivnosti novih spojeva. Jedna od najstarijih i najčešće korištenih tumorskih staničnih linija u svrhu istraživanja je HeLa, besmrtna stanična linija koja proizlazi iz stanica raka vrata maternice. Za razliku od ostalih ljudskih stanica koje se dijele određen broj puta (40- 50), nakon čega ulaze u fazu starenja tj. u proces stanične smrti, HeLa stanice imaju nevjerojatnu sposobnost da se dijele beskonačno.

U ovom je radu ispitan utjecaj proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na proliferaciju HeLa tumorske stanične linije. HeLa stanice uzgajane su *in vitro* pri čemu se pratio njihov rast te potrošnja glukoze tijekom četiri dana uzgoja. Kultura HeLa stanica tretirana je hidrolizatom

proteina iz pogače konoplje dobivenog djelovanjem enzima alkalaze, koji sadrži peptide različitih veličina te njegovom frakcijom peptida manjih od 3 kDa dobivenih ultrafiltracijom, kako bi se utvrdio njihov utjecaj na proliferaciju stanica određen MTS metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica je uzgoj stanica, izoliranih iz organa ili tkiva višestaničnih životinjskih organizama, u kontroliranim *in vitro* uvjetima u laboratoriju. Primjeri stanica koje se uzgajaju na ovakav način su fibroblast, limfociti, stanice srčanog i skeletnog tkiva, stanice jetre, dojke, kože i bubrega te različite vrste tumorskih stanica (Khanal, 2017.). Postoji razlika između primarne i sekundarne stanične kulture. Primarne stanice su izolirane direktno iz životinjskog organa ili tkiva, heterogene su i većina stanica se dijeli određen, ograničen broj puta. Međutim, one su mnogo sličnije roditeljskim stanicama te zadržavaju visokospecijalizirane funkcije tkiva iz kojeg su potekle. Subkultivacijom primarne stanične linije, nastaje sekundarna stanična linija (kultura) čime dobivamo generacije stanične linije. Pri tome, stanice sa najvećom sposobnošću rasta prevladaju, čime se postiže određeni stupanj genotipske i fenotipske uniformnosti u populaciji. Međutim, daljnom subkultivacijom, sekundarne stanice sve se više razlikuju od roditeljske, originalne stanice. Osim toga, razlikujemo konačne stanične linije koje gube mogućnost proliferacije nakon određenog broja staničnih dioba (ulaze u proces starenja) od kontinuiranih staničnih linija koje se dijele beskonačno. Kontinuirane stanične linije nastaju iz transformiranih/ mutiranih konačnih linija, a mutacija se može dogoditi spontano, može biti inducirana (kemijski, viralno) ili je dio malignih stanica (Castilho i sur., 2008; Khanal, 2017).

Brojne su prednosti upotrebe kulture životinjskih stanica: znatno smanjenje korištenja životinja u svrhu znanstvenih istraživanja, precizna kontrola fizikalno- kemijskih uvjeta (pH, temperatura, osmotski tlak, koncentracija otopljenih plinova) i fizioloških uvjeta (koncentracija hranjivih tvari, hormona itd.) u kulturi, proizvedene stanice su homogene i mogu se održavati kao čiste linije za istraživanja, mogućnost čuvanja kulture stanica u tekućem dušiku kroz dugo vremensko razdoblje sa pogodnim medijem za zamrzavanje (DMSO), stanice u kulturi mogu se veoma jednostavno kvantificirati te korištenje kulture stanica za *in vitro* testove citotoksičnosti određenih tvari i lijekova. Međutim postoje i određeni nedostaci kao što su: održavanje potpuno sterilnih (aseptičnih) uvjeta, mogućnost kemijske i mikrobne kontaminacije, kao i mogućnost unakrsne kontaminacije različitih vrsta kulture stanica, potrebno znanje, iskustvo i stručnost za rad, visoka kapitalna investicija, potrebne konstantne standardizacije medija, seruma i koncentracije hranjivih tvari te mogućnost genetičkih promjena unutar populacije stanica zbog njihovog brzog rasta (Butler, 2004).

2.1.1 Uvjeti (zahtjevi) za uzgoj kulture životinjskih stanica

1. Medij za uzgoj

Životinjske stanice mogu se kultivirati koristeći potpuno prirodan medij ili sintetički (umjetni) medij. Neke od vrsta prirodnih medija su biološke tekućine (serumi, plazma, limfa, amnionska tekućina) i ekstrakti tkiva (jetra, slezena, tumori, leukociti, ekstrakt goveđeg ili pilećeg embrija). Oni su primjenjivi za široki raspon kultura životinjskih stanica, no veliki problem predstavlja nepoznavanje točnog sastava prirodnog medija. Umjetni medij sastoji se od hranjivih tvari (organskih i anorganskih), vitamina, soli, plinova (O_2 i CO_2), seruma, ugljikohidrata i raznih kofaktora. Umjetni mediji mogu se svrstati u jednu od četiri kategorije: mediji koji sadrže serum, mediji bez dodanog seruma, kemijski definirani mediji i mediji bez proteina. Goveđi serum (bezstanična krvna komponenta) je najčešće korišten dodatak u kulturi životinjskih stanica koji osigurava optimalne uvjete za uzgoj. On je izvor hormona, faktora rasta, aminokiselina, proteina, ugljikohidrata, lipida, hormona, vitamina (posebno vitamina topljivih u mastima-A,D,E,K), minerala, inhibitora proteaza i mnogih drugih komponenti potrebnih za proliferaciju stanica te potiče vezanje stanica za podlogu (Butler, 2004). Također, on nosi (kelira) labilne ili netopljive hranjive tvari te veže i neutralizira toksične ostatke. Međutim, kemijski sastav seruma nije u potpunosti definiran te može sadržavati brojne kontaminante (viruse, prione, mikoplazme) zbog čega je nastala potreba za razvojem medija bez seruma (serum- free media). Oni su selektivni za određeni tip stanica, pri čemu moraju sadržavati sve komponente potrebne za rast i proliferaciju, koje inače osigurava serum. Takav medij se može smatrati kemijski definiranim medijem jer su sve komponente medija poznate. Kemijski definirani mediji sadrže organske i anorganske sastojke visoke čistoće zbog čega je u potpunosti onemogućena kontaminacija, dok je medij bez proteina (*protein- free media*) tj. medij oslobođen od bilo kakve proteinske molekule, pokazao da omogućava povećan rast stanica i ekspresiju proteina te lakše pročišćavanje proizvoda (*downstream*).

Medij za uzgoj stanica mora sadržavati neke osnovne komponente (aminokiseline, glukozu, soli, vitamine i ostale hranjive tvari) od kojih svaka ima veoma važnu ulogu (Arora, 2013):

- a) Pufer: Regulacija pH je veoma bitna za održavanje optimalnih uvjeta uzgoja, pri čemu postoji prirodni puferski sustav (ravnoteža CO_2 sa CO_3/HCO_3 koja se postiže održavanjem zasićenosti zraka uzgajane kulture sa 5-10 % CO_2) i kemijski puferski sustav, HEPES (zwitterionski sustav sa puferirajućim učinkom u pH rasponu 7,2- 7,4). Kao pH indikator uglavnom se koristi fenol-crveno koji omogućuje konstantno

praćenje pH uzgajane kulture (pri niskom pH medij se oboji žuto, dok se pri visokom pH oboji ljubičasto).

- b) Anorganske soli: One omogućuju održavanje osmotske ravnoteže i pomažu u regulaciji membranskog potencijala tako što opskrbljuju medij natrijem, kalijem, kalcijem itd.
- c) Aminokiseline: One su, kao gradivni blokovi proteina, obavezne komponente svih poznatih medija za uzgoj stanica, prijeko potrebne za staničnu proliferaciju. Posebno važne su esencijalne aminokiseline koje stanice ne mogu same sintetizirati, kao i L-glutamin koji osigurava dušik za NAD, NADPH i nukleotide te služi kao sekundarni izvor energije u metabolizmu. Neesencijalne aminokiseline također se mogu dodati u medij kako bi nadoknadile one koje su potrošene tijekom rasta stanica, što rezultira produženom vijabilnošću stanica.
- d) Ugljikohidrati: Šećeri su glavni izvor energije i ugljika. Većina medija sadrži glukozu i galaktozu, a poneki maltozu i fruktozu. Glukoza se većinom dodaje u koncentracijama od 5-25 mM. Stanice glukozu uglavnom metaboliziraju u procesu glikolize, uz formiranje piruvata koji ima dvije sudbine: u aerobnim uvjetima prelazi u acetil- CoA, koji ulazi u ciklus limunske kiseline (TCA ciklus), nakon čega slijedi oksidativna fosforilacija tj. razgradnja u potpunosti do CO_2 i H_2O , dok se u anaerobnim uvjetima metabolizira do laktata. U kulturi životinjskih stanica, opažena je povećana koncentracija laktata u mediju, što upućuje na to da metabolizam ne funkcionira jednako u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.
- e) Proteini i peptidi: Najčešće korišteni proteini i peptidi su albumin, transferin i fibronektin. Oni su posebno važni u mediju koji ne sadrži serum, dok je serum bogat izvor svih proteina, pa tako i gore navedenih. Albumin ima veliku sposobnost vezanja tvari zbog čega je odličan izbor za uklanjanje toksičnih tvari iz medija te u prenošenju lipida, vitamina i hormona u stanicu. Transferin transportira i opskrbljuje staničnu membranu željezom, dok je fibronektin glavni protein u povezivanju stanica i vezanju stanica za supstrat.
- f) Vitamini, hormoni i faktori rasta: Mnogi vitamini su esencijalni za rast i proliferaciju stanica. Vitamini B skupine su iznimno važni jer djeluju kao koenzimi i prostetske skupine brojnih enzima u metabolizmu (Castilho i sur., 2008). Od hormona se dodaju inzulin, hidrokortizon, trijodtironin te steroidni hormoni. Koncentracija vitamina i hormona ovisi o korištenom mediju te je veća kod nižih koncentracija seruma. Faktori rasta su visokospecifične, male proteinske molekule, koje stimuliraju određene stanične funkcije, potiču diferencijaciju stanica i povećavaju proliferaciju. Najvažniji su

EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), IGF-1 i IGF-2 (*insulin-like growth factors*) te PDGF (*platelet-derived growth factor*).

- g) Elementi u tragovima: Oni su esencijalni za brojne biološke procese, pogotovo u održavanju funkcionalnih i aktivnih enzima (kofaktori). Neki od najvažnijih su bakar, cink, željezo, mangan, selen (ima važnu katalitičku i antioksidativnu ulogu).

Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su (Yao i sur., 2017): BME (*Eagle's Basal Medium*), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*), DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*), RPMI-1640 i IMDM (*Iscoe's Modified Dulbecco's Medium*). BME je originalno oblikovan za rast mišjih stanica i HeLa stanica te se iz njega, kao poboljšanje, razvio EMEM koji sadrži uravnoteženu količinu soli te veću količinu neesencijalnih aminokiselina. Sadrži smanjenu količinu natrijevog bikarbonata (1500 mg/L) za korištenje uz zasićenje zraka sa 5% CO₂. Budući da EMEM nije kompleksan medij, obogaćen je (pojačan) dodatkom veće količine seruma kako bi bio prikladan za širok raspon životinjskih stanica. DMEM ima skoro duplo veću koncentraciju aminokiselina i četiri puta veću koncentraciju vitamina u odnosu na EMEM. Originalna formulacija medija sadržavala je 1000 mg/L glukoze, što je bilo optimalno za kultiviranje embrijskih mišjih stanica. Kasnije je formuliran medij sa 4500 mg/L glukoze koji se pokazao optimalnim za kultivaciju raznih vrsta životinjskih stanica. DMEM je osnovni medij koji ne sadrži proteine niti faktore rasta, zbog čega se obogaćuje sa 5-10% fetalnog goveđeg seruma (FBS - *Fetal Bovine Serum*). RPMI-1640 je medij koji ima širok spektar primjene za životinjske stanice, pogotovo za hematopoetske stanice (prvotno je razvijen za uzgoj limfocita). IMDM je visoko obogaćen medij prigodan za brzu proliferaciju stanica. On je modifikacija DMEM medija od kojeg se razlikuje po dodatnim aminokiselinama, vitaminima i anorganskim solima te sadrži selen, a kao puferski sustav HEPES. Razvijen je za uzgoj limfocita i hibridoma.

2. Ostali zahtjevi za uzgoj životinjskih stanica

Postoje određeni zahtjevi za uzgoj kulture životinjskih stanica. Jedan od njih je sterilno područje rada uz protok filtriranog zraka oko radne površine. Uz to, potreban je inkubator kako bi se stanice održavale na temperaturi od 30-40 °C (stanice sisavaca: 37 °C). Zamrzivači i frižideri su veoma važni za skladištenje tekućih medija na +4 °C i enzima (npr. tripsin) te nekih komponenata medija (glutamin ili serum) na -20 °C. Također, ako se žele uskladištiti uzorci kulture stanica na neko vrijeme, provodi se zamrzavanje stanica u tekućem dušiku. Stanice se zamrznu u eksponencijalnoj fazi rasta koristeći DMSO (dimetil sulfoksid)

brzinom od 1 °C/min do konačnih -50 °C i nakon toga se čuvaju pri -196 °C uronjene u tekući dušik.

Još jedan bitan uvjet je održavanje optimalnog pH. Većina medija održava pH između 7-7,4 jer pH ispod vrijednosti 6,8 inhibira rast stanica. Optimalni pH je veoma bitan kako bi se održala odgovarajuća ionska ravnoteža, funkcionalnost celularnih enzima i vezanje hormona i faktora rasta za površinske stanične receptore. pH se održava koristeći određene puferske sustave navedene gore. Osmolalnost je koncentracija otopine izražena kao ukupni broj otopljenih čestica odnosno osmotski aktivnih čestica po kilogramu otapala. Koncentracija soli, šećera i aminokiselina određuje osmolalnost medija. Većina staničnih linija dobro tolerira promjene osmotskog tlaka. Svi komercijalni mediji su tako formulirani, da njihova osmolalnost iznosi oko 300 mOsm. Povećana osmolalnost medija negativno utječe na rast i proliferaciju stanica pa je poželjno kulturu održavati u blago hipotoničnom mediju (Vrkić, 2017).

Kisik je često limitirajući faktor zbog slabe topljivosti u vodi i vodenim otopinama, a mnogi sastojci podloge, poput soli i glukoze, dodatno smanjuju njegovu topljivost u mediju za uzgoj. Održavanje kisika u dovoljnim količinama za normalan rast i proliferaciju stanične kulture iznimno je bitan i zahtjevan zadatak, kako u laboratoriju tako i u velikom mjerilu, bioreaktoru. Za većinu je kultura stanica dovoljan atmosferski kisik, dok je za kulture tkiva potrebno osigurati kontroliranu atmosferu sa 95% O₂ (Castilho i sur., 2008).

Kod rada s kulturom stanica nužno je održavati aseptične uvjete zbog visoke osjetljivosti stanica na kontaminante poput bakterija, kvasaca i plijesni. Kontaminacija se očituje u naglom padu pH vrijednosti ili zamućenju medija. Medij koji ne može biti autoklaviran, mora se sterilizirati kroz membranski filter veličine pora 0,22 µm. Ako nije moguće održavati dobre aseptične uvjete, potrebno je u medij dodati antibiotike (penicilin, streptomycin) ili antimikotike (kanamicin). Također, sva oprema koja se koristi mora se oprati, sterilizirati (pipete) na 160 °C ili autoklavirati (boce) na 121 °C/ 20 min.

2.1.2. HeLa stanična linija

Hela je besmrtna stanična linija, najstarija i najčešće korištena u svrhu znanstvenih istraživanja. Linija proizlazi iz stanica raka vrata maternice koje su uzete 8. 2. 1951. od Henriette Lacks, pacijentice koja je umrla od raka, 4. 10. 1951. Stanična linija je izvanredno izdržljiva i dobro se razmnožava, što opravdava njenu opsežnu uporabu u brojnim istraživanjima. HeLa stanice su prve humane stanice uzgojene u laboratoriju koje su bile

prirodno „besmrtna“ tj. one ne umiru nakon određenog broja dioba, već se beskonačno dijele i obnavljaju. Razlog tome je postojanje pretjerano aktivnog enzima telomerase koji konstantno ponovno izgrađuje telomere kromosoma, tako da se one ne skraćuju nakon svake diobe i ne uzrokuju starenje stanica. HeLa stanice rastu brže i od drugih tumorskih stanica, o čemu svjedoči vrijeme potrebno za njihovo udvostručenje koje iznosi manje od 24 sata. Za razliku od normalnih ljudskih stanica koje sadrže 46 kromosoma, HeLa stanice sadrže 76-80 mutiranih kromosoma. Takve mutacije proizlaze iz HPV-a (Humani papilloma virus) koji uzrokuje gotovo sve tumore vrata maternice. HPV insertira svoju DNA u stanicu domaćina, uzrokujući proizvodnju proteina koji se veže za nativni protein p53 i inaktivira ga. Protein p53 je „čuvar“ genoma jer sprječava mutacije i suprimira (suzbija) tumore pa tako nefunkcionalan p53 može imati katastrofalne posljedice po stanicu (Carpio, 2014).

Stabilan rast HeLa stanica omogućio je virologu Jonasu Salku da 1952. godine uspješno uzgoji polio virus, što je dovelo do razvoja cjepiva protiv dječje paralize. Od onda su korištene u brojnim istraživanjima, uključujući izlaganje raznim virusima: herpesa, ospica, zaušnjaka, konjskog encefalitisa, HIV-a kako bi se proučio način na koji virusi prodiru u stanicu, razmnožavaju se i šire. Na njima su ispitivali posljedice steroida, citostatika, hormona, vitamina i stresa. Također, pomogle su u razvoju oplodnje *in vitro* te donijele veliki napredak ljudskoj genetici tako što su pomogle u otkrivanju broja ljudskih kromosoma i razvijanju tehnike bojenja kromosoma višebojnim fluorescentnim bojama koje svijetle pod ultraljubičastim svjetlom (FISH). Tako su stvoreni preduvjeti za stvaranje mape ljudskog genoma. Zbog svega navedenog, HeLa stanice su poznate kao „majka“ virologije, kulture stanica i tkiva te biotehnologije. Jedini veliki problem u radu s njima je što su veoma „agresivni“ kontaminanti drugih stanica u laboratoriju. Uz to, mnogi znanstvenici danas žele raditi sa stanicama koje više naliče normalnim ljudskim stanicama, umjesto sa HeLa stanicama veoma neobičnog kariotipa.

2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI

Bioaktivni peptidi su prirodne kemijske tvari koje se nalaze u biljkama i životinjama te pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje. Zbog visoke specifičnosti i afiniteta za tkivo te pozitivnog učinka na zdravlje, postaju sve zanimljiviji izbor za znanstvena istraživanja. Tijekom godina, dokumentirani su brojni potencijalni bioaktivni peptidi iz hrane, međutim i dalje postoje prepreke kao što su uspostavljanje optimalnih uvjeta za proizvodnju u industrijskom mjerilu kao i odsustvo relevantnih kliničkih testova kako bi se dobio snažan dokaz pozitivnog učinka na zdravlje (Daliri i sur., 2017).

Proteini iz hrane ne služe samo kao nutrijenti, već imaju fizikalno-kemijsku ulogu u održavanju zdravlja. Bioaktivni peptidi oslobađaju se tijekom enzimske proteolize proteina (gastrointestinalna digestija, *in vitro* hidroliza proteolitičkim enzimima) ili tijekom obrade hrane (kuhanje, fermentacija...). Oni su neaktivni unutar „roditeljskog” proteina, a aktiviraju se tek nakon što su oslobođeni proteolizom. Enzimska proteoliza preferira se za proizvodnju bioaktivnih peptida, u odnosu na mikrobnu fermentaciju zbog jednostavnosti, kratkog vremena reakcije te bolje kontrole krajnjeg sastava. Na opseg proteolize i duljinu dobivenih peptida utječu vrsta enzima koji se koristi, temperatura, vrijeme hidrolize i brojni drugi čimbenici (Daliri i sur., 2017). Nekoliko proteolitičkih enzima (sirovi ili pročišćeni) koriste se za hidrolizu proteina i dobivanje hidrolizata koji sadrži kratke peptidne sekvence. Iako nije poznato da neki specifičan proteolitički enzim daje specifične bioaktivne sekvence (peptide), dokazano je da hidroliza alkalazom (subtilizinom) pridonosi stvaranju peptida male molekulske mase, od kojih su neki bioaktivni. Smatra se da su peptidi male molekulske mase (od 1 do 10 kDa) efikasniji antioksidansi i antihipertenzivi u odnosu na peptide veće molekulske mase. Nakon provedene enzimske proteolize, smjesa se centrifugira kako bi se odvojio supernatant, koji sadrži sekvence peptida, od taloga. Također, moguće je daljnje pročišćavanje i separacija peptida na osnovu hidrofobnosti, naboja ili veličine peptida.

Bioaktivni peptidi su uglavnom veličina 2-20 aminokiselinskih ostataka, iako neki mogu imati i 2-50 ostataka. Ovisno o veličini peptida i vrsti aminokiselina u peptidnoj sekvenci, posjeduju različite fiziološke aktivnosti koje pridonose poboljšanju i očuvanju zdravlja. Neke od tih aktivnosti su antimikrobna, antioksidacijska, antitumorska, antitrombotička, antihipertenzivna, imunomodulacijska, protuupalna, antidijabetička, prebiotička te antiproliferacijska. Sve te bioaktivnosti pozitivno utječu na tjelesni sustav, uključujući kardiovaskularni, probavni, endokrini, imunološki i živčani sustav, što se očituje u prevenciji bolesti u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Girgih i sur., 2013).

Globalna rasprostranjenost kroničnih degenerativnih bolesti kao što su pretilost, dijabetes, tumor te kardiovaskularne bolesti je vrlo velika. To mnoštvo različitih bolesti dovodi se u vezu sa staničnim oksidativnim stresom koji nastaje zbog prekomjerne proizvodnje reaktivnih oblika kisika (Reactive Oxygen Species- ROS) tj. slobodnih radikala. ROS/ slobodni radikali su veoma nestabilni i visoko reaktivni zbog postojanja nesparenih elektrona. Kao takvi, ponašaju se kao reducenski/oksidansi zbog tendencije da oduzmu vodik ili doniraju kisik (ili elektrone) drugim tvarima. Takve reaktivne tvari napadaju i oštećuju makromolekule kao što su lipidi, ugljikohidrati, DNA, proteini i stanične membrane što uzrokuje narušavanje homeostaze u stanici. Uz to, takve oksidativne modifikacije biomolekula uključene su u brojne fiziološke i patofiziološke procese: starenje, ateroskleroza, razne upale, kancerogeneza, toksičnost lijekova itd. (Girgih i sur., 2013). Nedavna istraživanja i klinička ispitivanja pokazala su da povećana konzumacija proteina, pogotovo iz biljaka djeluje kao moćan antioksidacijski agens koji može umanjiti prekomjerno nastajanje ROS-a, odnosno slobodnih radikala, stoga se fokusiraju na proizvodnju, identifikaciju i karakterizaciju bioaktivnih peptida iz biljnih organizama.

2.2.1. Sjeme konoplje

Konoplja (*Cannabis sativa L.*, *Cannabaceae*) je jedan od najstarijih višenamjenskih usjeva koji se kultivira preko 6000 godina. Ona je jednogodišnja biljka koja služi kao izvor hrane, vlakana i ljekovitih tvari tisućama godina u Europi, Aziji i Africi (Garcia, 2017). Već dugi niz godina, znanstvenici istražuju utjecaj kanabidiola (CBD) i tetrahidrokanabinola (THC) na ljudsko zdravlje. U novom radu, prezentiranom 2018 na *Experimental Biology meeting*, znanstvenici sa sveučilišta Sullivan pokazali su da konoplja posjeduje antitumorska svojstva koja mogu usporiti širenje bolesti, odnosno može koristiti kao učinkovit tretman za rak jajnika. Prema *American Cancer Society*, CBD i THC su terapijski vrijedne komponente, pri čemu CBD može liječiti napadaje i umanjiti anksioznost, dok THC ublažava bolove i mučninu, odnosno nuspojave s kojima se moraju nositi oboljeli od raka. Međutim, zadnjih godina sve je veća pažnja usmjerena na sjeme konoplje kao bogat izvor proteina, odnosno bioaktivnih peptida koji djeluju pozitivno na ljudsko zdravlje.

Sjeme konoplje ili „srce“ konoplje je nusproizvod koji se dobije nakon iskorištenja usjeva konoplje za vlakna. Ono sadrži preko 30% ulja i 25% visoko kvalitetnih proteina te veoma niski udio THC-a (~ 0,3%). Koristi se u proizvodnji brojnih proizvoda za kozmetiku, terapijiku, funkcionalnu hranu te nutraceutike. Sjeme je bogat izvor proteina i polinezasićenih masnih kiselina, pogotovo α -linolenske kiseline (ω -3 masna kiselina) te

linolne i γ -linolenske kiseline (ω -6 masne kiseline), koje imaju pozitivan učinak na zdravlje, pogotovo u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i regulaciji kolesterola (Girgih i sur., 2011).

Sjeme konoplje sadrži više iskoristivih proteina po gramu, nego skoro sva ostala hrana (sadrži 25 g proteina /100 g, što je više nego svi drugi biljni izvori i više ili jednako kao meso i riba). Proteini zaostali nakon izdvajanja ulja iz sjemena konoplje (tzv. uljne pogače) su lako probavljivi, za razliku od životinjskih proteina i proteina iz mliječnih proizvoda. Pogača sadrži dva glavna visoko kvalitetna i lako probavljiva proteina: edestin i albumin, koji sadrže svih 9 esencijalnih aminokiselina neophodnih za ljudski organizam u nutritivno značajnim količinama (Garcia, 2017). Uz to, ne sadrži tripsin inhibitor, koji blokira funkciju tripsina. Tripsin je probavni enzim kojeg luči gušterača, a funkcija mu je da cijepa proteine u tankom crijevu kako bi organizam mogao iskoristiti sve dostupne aminokiseline i ostale nutrijente. Na taj način, proteini iz sjemena konoplje su u potpunosti iskorišteni, odnosno „razbijeni“ na aminokiseline i probavljeni. Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva proteina u sjemenu konoplje uspoređena su sa proteinima iz soje, pri čemu su proteini iz konoplje imali veću koncentraciju svih esencijalnih aminokiselina, osim lizina. Proteini konoplje imaju velike količine aminokiselina koje sadrže sumpor- metionin i cistein, kao i visoku razinu arginina i glutaminske kiseline.

Hidrolizat proteina dobiven nakon izdvajanja proteina iz pogače konoplje pokazao je, u brojnim znanstvenim istraživanjima, da posjeduje multifunkcionalne bioaktivne peptide, primjerice WVYY i PSLPA koji pokazuju značajan antioksidacijski i antihipertenzijski učinak (Girgih i sur., 2013). Međutim, proteini iz pogače konoplje nisu još u potpunosti istraženi i nisu poznati mehanizmi oslobađanja tih bioaktivnih peptida.

Na temelju svega navedenog, cilj ovog rada bio je ispitati kako hidrolizat proteina iz pogače konoplje i njegova frakcija manja od 3 kDa utječu na proliferaciju tumorske stanične linije HeLa.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. HeLa stanična linija

U svrhu istraživanja, korištena je HeLa stanična linija, dobivena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. HeLa stanice su morfološki epitelne, a prema načinu uzgoja adherentne stanice. Kod adherentnih staničnih kultura broj stanica izravno ovisi o raspoloživosti površine na kojoj stanice mogu rasti, pri čemu se takva kultura održava do pojave konfluentnosti, tj. potpune prekrivenosti površine stanicama (Slivac, 2016.), a pomoću enzima tripsina skidamo ih sa ploča u svrhu subkultiviranja ili brojanja stanica. HeLa stanice uzgajaju se u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂) na pločama s jažicama, u DMEM hranjivom mediju uz dodatak 10% FBS-a (fetalnog telećeg seruma).

3.1.2. Hidrolizat iz pogače konoplje

Hidrolizat proteina izoliranih iz pogače konoplje pripremljen je i frakcioniran u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

3.1.3. Kemikalije

0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Fetalni teleći serum (FBS), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevazol)), Promega, SAD

Trypan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

GOD-PAP kit za određivanje koncentracije glukoze, Herbos, Sisak, Hrvatska

3.1.4. Otopine i puferi

0,4% otopina tripan – plavo:

Boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20,00 mL

PBS pufer (pH= 7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, pipete, menzure, kivete)

Ploče s 12 jažica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

T-boce od 25 cm², Corning, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj HeLa stanica

Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje pri -70 °C, a uzgoj započinje njihovim odmrzavanjem. Ampula sa stanicama (1 mL) odmrzne se uranjanjem u vodenu kupelj, nakon čega slijedi centrifugiranje kako bi se uklonio medij za zamrzavanje. Nakon centrifugiranja, supernatant se ukloni, a talog resuspendira u DMEM hranjivom mediju, uz dodatak 10% FBS-a (čuva se na -20 °C), u odgovarajućim T- bocama. Slijedi uzgoj HeLa stanica u jažicama u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂), uz početnu koncentraciju 5×10⁴ st/mL. Prati se rast HeLa stanica i potrošnja glukoze u podlozi kroz 4 dana, pri čemu se stanice uzgajaju u 12 jažica (3 paralele za svaki dan).

Za određivanje kinetike rasta i potrošnje glukoze, stanice se izvade iz termostata i u digestoru se pipetmanom odstrani DMEM medij tj. podloga u kojoj su uzgajane stanice. Medij se pohrani u kivete i smrzne za određivanje koncentracije glukoze. Nakon što se ukloni

medij, u jažice (3 paralelna uzorka) se doda 100 μL tripsina pa se ostavi da tripsin djeluje na stanice 5-7 min u inkubatoru. Uloga tripsina je kidanje veza između stanica i podloge te stanica međusobno (HeLa stanice su adherentne stanice). Nakon 5-7 min, pod mikroskopom se provjerava da li su se stanice odvojile, zaokružile, tj. kreću li se slobodno. Ako je to slučaj, u komori za sterilan rad se prekida djelovanje tripsina (kako ne bi došlo do proteolize stanica), dodatkom 400 μL DMEM podloge (uz 100 μL tripsina, ukupni volumen ponovno 500 μL). Potom se uzima uzorak suspenzije stanica za brojanje u Neubauerovoj komorici metodom tripan- plavo.

3.2.1.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

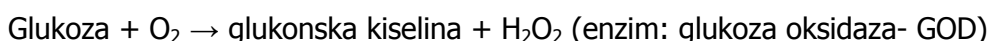
Stanice se broje u Neubauerovoj komorici koja se sastoji od 9 velikih kvadrata, pri čemu su stanice brojane u 4 okolna kvadrata koji okružuju mrežicu tj. kvadrate koji tvore „križ“. Ta 4 okolna kvadrata ukupne površine 1 mm^2 , sastoje se od 16 manjih kvadratića.

Iz kivete koja sadrži 500 μL medija sa stanicama, uzme se 10 μL , pomiješa sa 10 μL boje tripan-plavo, dobro resuspendira te nanese na predmetnicu (Neubauerova komorica) i preklopi pokrovnicom. Slijedi brojanje stanica, pri čemu razlikujemo mrtve plavo obojane stanice od živih, neobojanih. Žive stanice su veoma selektivne prema tvarima koje prolaze kroz njihovu membranu, pa tako ne propuštaju boju tripan-plavo. Međutim, mrtve stanice nemaju funkcionalnu membranu, pa boja tripan-plavo prolazi kroz nju, pri čemu se stanice oboje plavo. Broj stanica u komorici izračuna se iz izraza:

$$\text{broj stanica} / \text{mL suspenzije} = \text{zbroj stanica unutar 4 kvadrata} \times 5000$$

3.2.1.2. Određivanje koncentracije glukoze GOD PAP testom

Glukoza-GOD PAP (fenol i aminoantipirin) test temelji se na enzimsko-kolorimetrijskoj metodi određivanja koncentracije glukoze u podlozi, prema sljedećim reakcijama:



Koncentracija glukoze je proporcionalna koncentraciji konačnog produkta crvenog kinona, koja se odredi spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 500 nm. Od kemikalija potreban je Reagens koji se sastoji od fosfatnog pufera ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), fenola ($c = 0,75 \text{ mmol/L}$), 4- aminoantipirina ($c = 0,25 \text{ mmol/L}$), enzima glukoza oksidaze (aktivnost = ≥ 15

kU/ L) te enzima peroksidaze (aktivnost= $\geq 1,5$ kU/L). Apsorbancija se mjeri slijepoj probi, standardu i uzorku, u 2 paralele. Slijepa proba pripremi se tako da se u 10 μ L destilirane vode doda 1 mL Reagensa. Za pripremu standarda ($c = 5,56$ mmol/L) potrebno je u 10 μ L standarda dodati 1 mL Reagensa, a za pripremu uzorka dodati 1 mL Reagensa u 10 μ L uzorka koji je u mom slučaju medij u kojem su uzgajane HeLa stanice, izuziman tijekom 4 dana kako bi se odredila koncentracija glukoze. Pripremljeni uzorci inkubiraju se na sobnoj temperaturi 20 minuta nakon čega im se mjeri apsorbancija pri 500 nm. Koncentracija glukoze se prema formuli:

$$c(\text{glukoza}) = \frac{A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{standard}}} \times c(\text{standard})$$

pri čemu je $c(\text{standard}) = 5,56$ mmol/L.

3.2.2. Određivanje učinka proteinskih hidrolizata konoplje na vijabilnost HeLa stanica

Proteinski hidrolizati iz pogače konoplje dobiveni su djelovanjem enzima alkalaze (50 °C, pH=8) na proteinski izolat iz pogače konoplje koji je pripravljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Hidrolizom s enzimom alkalazom, dobiven je ishodni hidrolizat koji sadrži peptide različitih veličina, a postupkom ultrafiltracije dobivena je frakcija peptida manjih od 3 kDa. Početna koncentracija proteina u ishodnom hidrolizatu i frakciji s peptidima manjim od 3 kDa određena je metodom po Lowryu, a MTS metodom određena je vijabilnost HeLa stanica nakon tretmana navedenim proteinskim hidrolizatima.

3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryu

Metoda po Lowryu je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina koja se temelji na reakciji Cu^{2+} iona sa peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju, pri čemu dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^{+} . Nakon toga, u reakcijsku smjesu doda se Folin-Ciocalteu reagens koji reagira sa Cu^{+} -protein kompleksom, kao i sa pobočnim lancima aminokiselina tirozin, triptofan i cistein stvarajući u početku nestabilan kompleks koji se polako reducira, pri čemu se razvija plavo obojenje. Mjerena apsorbancija (pri 740 nm) proporcionalna je intenzitetu obojenja koje je proporcionalno koncentraciji proteina, iz čega proizlazi da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji proteina.

Sastav reagensa je sljedeći :

Reagens A: 2 g NaOH + 10 g Na_2CO_3 u 500 mL destilirane vode

Reagens B1: 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 100 mL destilirane vode

Reagens B2: 2 g KNa- tartarata u 100 mL destilirane vode

Reagens C: 50 mL reagensa A + 0,5 mL reagensa B1 + 0,5 mL reagensa B2

Za određivanje koncentracije proteina, ishodni hidrolizat razrijedi se 500×, a frakcija s peptidima manjim od 3 kDa 100×. Postupak započinje miješanjem 1 mL reagensa C s 200 µL uzorka (hidrolizati proteina). Nakon 15 min, doda se 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa, promiješa na vrtložnoj mješalici i nakon 55 min stajanja odredi apsorbancija pri 740 nm. Koncentracija proteina odredi se iz jednadžbe baždarnog dijagrama, koji je dobiven određivanjem apsorbancije uzoraka standardnog proteina (albumin goveđeg seruma) poznate koncentracije.

3.2.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

Kako bi se odredio učinak hidrolizata proteina iz pogače konoplje na vijabilnost HeLa stanica, stanice su nacijeppljene u jažice u početnoj koncentraciji od 5×10^4 st/mL. Nakon 24 sata stanicama je dodan hidrolizat proteina (ishodni i frakcija <3 kDa) u koncentraciji od 1, 2 i 5 mg/mL. Vijabilnost stanica nakon tretmana hidrolizatima određena je MTS kolorimetrijskom metodom. MTS metoda temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni, topljivi formazan, djelovanjem NAD(P)H-ovisne dehidrogenaze. U svaku jažicu doda se 10 µL MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija. Stanice se inkubiraju tijekom 3 sata i 37°C, uz 95% vlažnosti zraka i 5% CO₂. Apsorbancija se mjeri na čitaču mikrotitarskih ploča pri 492 nm. Ona je proporcionalna intenzitetu boje koji je proporcionalan broju živih stanica. Vijabilnost (preživljenje) se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica se definira kao 100% preživljenja. Dobiveni se rezultati izraze kao postotak kontrole prema izrazu:

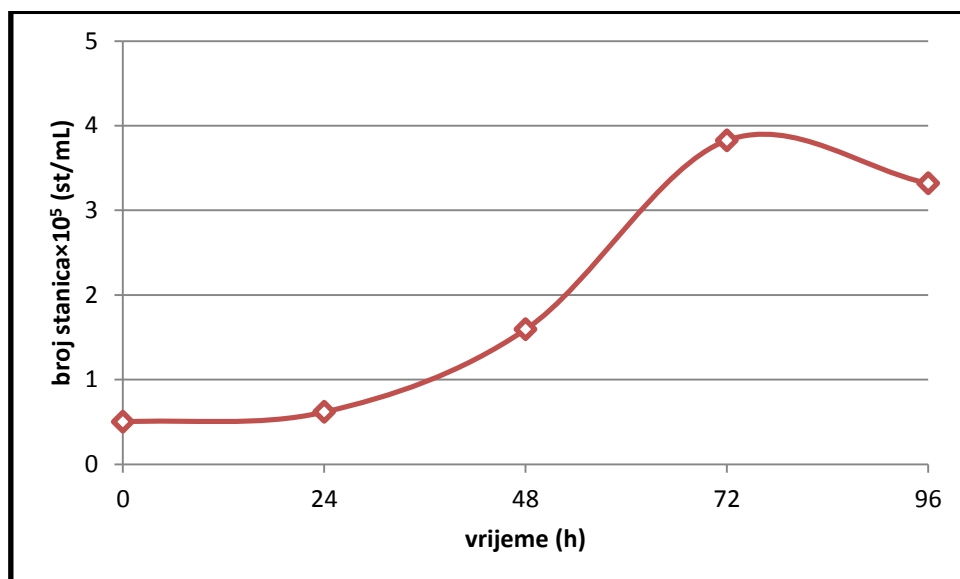
$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\overline{A_{490}} (\text{tretirane stanice})}{\overline{A_{490}} (\text{kontrolne stanice})} \times 100$$

4. REZULTATI

4.1. Praćenje kinetike rasta HeLa stanica i potrošnje supstrata (glukoze) u podlozi

4.1.1. Kinetika rasta HeLa stanica

HeLa stanice uzgajane su tijekom 4 dana, pri čemu se pratila kinetika rasta te potrošnja glukoze u podlozi. Početna koncentracija stanica (nulti dan) iznosila je 5×10^4 st/mL, a prirast stanica tijekom 4 dana pratio se brojanjem stanica metodom tripan-plavo. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 1.



Slika 1. Krivulja rasta HeLa stanica tijekom 4 dana uzgoja

Na temelju broja stanica izračunati su parametri rasta HeLa stanica:

1. Specifična brzina rasta : $\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} = \frac{\ln(3,825 \times 10^5) - \ln(6,167 \times 10^4)}{48 \text{ h}} = 0,038 \text{ h}^{-1}$

2. Prinos stanica: broj stanica na kraju log faze – broj stanica na početku :

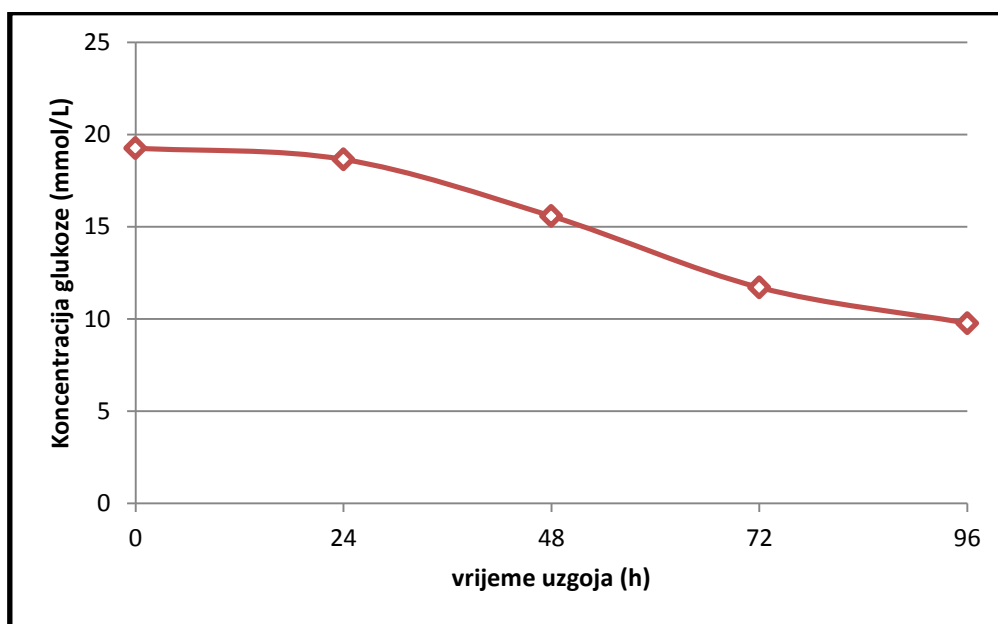
$$X = 3,285 \times 10^5 \text{ st/mL} - 5 \times 10^4 \text{ st/mL} = 2,785 \times 10^5 \text{ st/mL}$$

3. Vrijeme udvostručenja stanica (Population Doubling Time- PDT):

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0,038} = 18,24 \text{ h} \sim 18 \text{ h}$$

4.1.2. Utrošak glukoze u mediju za uzgoj tijekom uzgoja HeLa stanica

Tijekom uzgoja HeLa stanica, sakupljeni su uzorci medija za uzgoj i u njima je određena koncentracija glukoze prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.2. Rezultati su prikazani na slici 2.



Slika 2. Promjena koncentracije glukoze u mediju za uzgoj tijekom 4 dana uzgoja HeLa stanica

Potrošnja supstrata (glukoze) : $\Delta S = S_0 - S = 19,26 \text{ mmol/L} - 9,769 \text{ mmol/L} = 9,491 \text{ mmol/L}$

Potrošnja glukoze u podlozi odgovara kinetici rasta HeLa stanica, pri čemu je najveća potrošnja glukoze od 1. do 3. dana kada se stanice nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

4.2. Učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na vijabilnost HeLa stanica

4.2.1. Određivanje koncentracija proteina iz pogače konoplje u ishodnom hidrolizatu i njegovoj frakciji

Kao što je prethodno navedeno, koncentracija proteina nakon provedbe metode po Lowryu, odredi se iz jednadžbe baždarnog dijagrama, koji je dobiven određivanjem apsorbancije uzoraka proteina poznate koncentracije. Jednadžba glasi: $y = 2,32x + 0,0488$, pri čemu je y vrijednost apsorbancije, a x koncentracija proteina u ispitivanom uzorku.

$$\overline{A_{740}} \text{ (ishodni hidrolizat alkalaze)} = 0,326 ; \overline{A_{740}} \text{ (frakcija hidrolizata <3 kDa)} = 0,494$$

Nakon uvrštavanja navedenih vrijednosti apsorbancija na mjesto y u jednadžbu, koncentracije proteina u uzorcima (x) iznose:

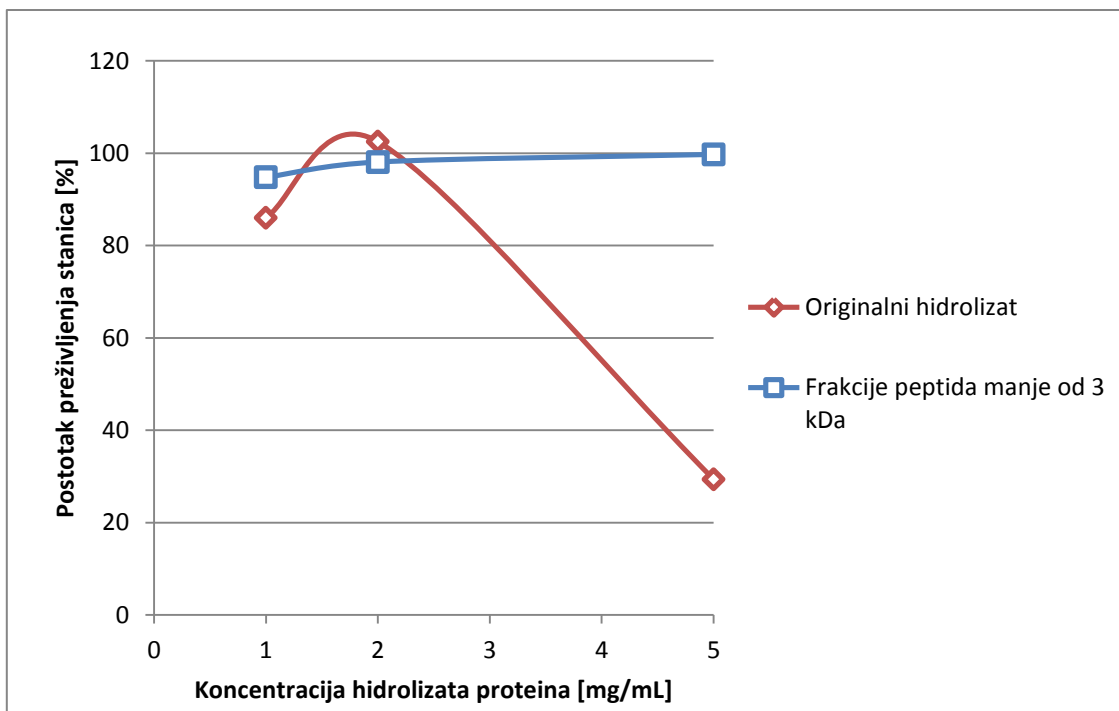
$$C_{\text{proteina}} \text{ (ishodni hidrolizat, razrijeđen 500 x)} = \underline{59,813 \text{ mg/mL}}$$

$$C_{\text{proteina}} \text{ (frakcija hidrolizata <3 kDa, razrijeđen 100 x)} = \underline{19,189 \text{ mg/mL}}$$

Na temelju izračunatih početnih koncentracija proteina u hidrolizatima, pripremljeni su ishodni hidrolizat i frakcija peptida <3 kDa u koncentracijama od 1, 2 i 5 mg/mL kojima su tretirane HeLa stanice, nakon čega je određena njihova vijabilnost MTS metodom.

4.2.2. Učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na vijabilnost HeLa stanica

HeLa stanice, u početnoj koncentraciji od 5×10^4 st/ mL, naciepljene su u jažice i tretirane ishodnim hidrolizatom koji sadrži peptide različitih veličina te hidrolizatom koji sadrži frakcije peptida veličine <3 kDa. Vijabilnost HeLa stanica ispitana je MTS metodom koristeći oba hidrolizata sa različitim koncentracijama proteina: 1, 2 i 5 mg/mL. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 3.



Slika 3. Učinak različitih koncentracija proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na preživljenje HeLa stanica

Iz dobivenih rezultata, možemo zaključiti da najveće inhibitorno djelovanje ima ishodni hidrolizat pri koncentraciji proteina od 5 mg/mL, pri čemu inhibira rast 70,6% populacije stanica, odnosno samo 29,4 % populacije stanica je živo. Blago inhibitorno djelovanje isti uzorak pokazuje i pri koncentracije od 1 mg/mL (preživljenje 86,03 % stanica). Frakcija hidrolizata peptida manjih od 3 kDa, pri svim ispitanim koncentracijama, ne pokazuje inhibicijsko djelovanje na HeLa stanice.

5. RASPRAVA

Biološki aktivni peptidi iz prirodnih izvora (poput uljarica i konoplje) našli su primjenu kao funkcionalna hrana ili u pripravcima koji sprječavaju mnoga oboljenja. Sukladno trendovima modernoga života i zahtjevima za što prirodnijim tvarima u prehrani, ovi se peptidi naveliko istražuju. Prisustvo bioaktivnih komponenti koje promiču zdravlje, pronađenih u proteinima iz sjemena konoplje, znatno su povećale vrijednost ionako cijenjene biljke konoplje. U radu Girgiha i sur. (2014 i 2015), dokazana su antihipertenzijska svojstva hidrolizata proteina iz sjemena konoplje koji su ispitani na *in vitro* inhibiciju renina i angiotenzina, dva enzima koja reguliraju ljudski krvni tlak. U istraživanju Girgih i sur. (2011) dokazano je da hidrolizat proteina iz sjemena konoplje i njegove frakcije dobivene postupkom ultrafiltracije posjeduju *in vitro* antioksidacijska svojstva tj. mogućnost uklanjanja visoko reaktivnih slobodnih radikala. To ukazuje na potencijal u proizvodnji peptidnih sekvenci koje se mogu koristiti za formulaciju funkcionalne hrane i nutraceutika sa multifunkcionalnim bioaktivnim svojstvima protiv slobodnih radikala koji mogu prouzročiti bolesti vezane uz oksidativni stres.

Klasičan pristup otkrivanju bioaktivnih peptida u hrani uključuje hidrolizu proteina proteolitičkim enzimima uz oslobađanje brojnih peptidnih fragmenata u hidrolizatu kojem se može ispitati *in vitro* biološka aktivnost (Aluko, 2017). Ukoliko se pokaže dobra *in vitro* bioaktivnost, to se provjerava tj. potvrđuje kroz *in vivo* ispitivanja. Bioaktivni hidrolizat se onda može razviti u funkcionalnu hranu ili se bioaktivni peptidi iz hidrolizata mogu razdvojiti i pročistiti u nutraceutike za nefarmakološku terapiju.

Kako bi se ispitao potencijalni biološki učinak hidrolizata proteina pripremljenih iz pogače konoplje u ovom radu je određen njegov učinak na proliferaciju humane tumorske stanične linije HeLa. Najprije je praćen rast HeLa stanica tijekom 4 dana uzgoja i potrošnja supstrata (glukoze) u podlozi, vezana uz povećanje broja stanica. Stanice su brojane metodom tripan-plavo, pri čemu je kao rezultat dobivena tipična krivulja rasta, koja uključuje lag fazu (faza prilagodbe tek nacepljenih stanica na podlogu), log fazu (faza eksponencijalnog rasta, udvostručenje broja stanica stalnom brzinom) te stacionarnu fazu (broj živih stanica u ravnoteži s brojem mrtvih stanica) koja prelazi u fazu odumiranja zbog potrošnje hranjivih sastojaka podloge. Iz krivulje rasta HeLa stanica može se vidjeti faza prilagodbe stanica na uvjete u mediju za uzgoj koja traje tijekom prvih 24 sata uzgoja. Slijedi eksponencijalna faza rasta, tj. faza udvostručenja broja stanica od 1. do 3. dana, nakon čega stanice ulaze u stacionarnu fazu rasta zbog potrošnje hranjivih sastojaka podloge. Također, izračunati parametri rasta odgovaraju literaturnim podacima. Vrijeme udvostručenja HeLa stanica iznosi

18 sati, što odgovara činjenici da su HeLa stanice jedne od najbrže replicirajućih humanih stanica, uz vrijeme udvostručenja unutar 24 sata. Krivulja promjene koncentracije glukoze u podlozi odgovara brzini rasta HeLa stanica, pri čemu je najveći pad koncentracije od 1. do 3. dana kada su stanice u eksponencijalnoj fazi rasta.

Učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na preživljenje HeLa stanica prikazan je na slici 3. U ovom radu korišten je hidrolizat proteina iz pogače konoplje, dobiven djelovanjem enzima alkalaze, pri čemu je dobiven ishodni hidrolizat koji sadrži peptide različitih molekulskih masa, a ultrafiltracijom je pripravljena frakcija koja sadrži peptide veličine manje od 3 kDa. Uz to, oba uzorka su pripremljena na način da sadrže različite koncentracije proteina tj. 1, 2 i 5 mg/mL. HeLa stanice tretirane su navedenim koncentracijama hidrolizata i njegove frakcije, nakon čega im je MTS metodom određen postotak preživljenja. Najveće inhibitorno djelovanje postignuto je s ishodnim hidrolizatom pri koncentraciji proteina od 5 mg/mL, kada je preživljenje stanica iznosilo 29,40%. Ishodni hidrolizat pri koncentraciji proteina od 1 mg/mL izazvao je preživljenje od 86,03%. Istovremeno, frakcija peptida manjih od 3 kDa ne pokazuje značajniji učinak na proliferaciju HeLa stanica, a vijabilnost se kreće u rasponu 94-100%.

Da bi se dokazalo da hidrolizat proteina iz pogače konoplje zaista ima određeni učinak na proliferaciju tumorskih stanica, potrebno je provesti još brojna *in vitro* ispitivanja. Također, potrebno je utvrditi koji peptidi odnosno njihova veličina izazivaju inhibiciju rasta HeLa stanica u ishodnom hidrolizatu kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti s rezultatima drugih istraživanja (npr. Girgih i sur., 2011.) kada su se najučinkovitijima pokazali bioaktivni peptidi veličina do 10 kDa.

Dublje izučavanje i poznavanje strukturnih i funkcionalnih svojstava peptida iz pogače konoplje pridonijet će otkriću još moćnijih peptida iz drugih izvora, ali i razviti primjerene procesne uvijete za proizvodnju i oslobađanje bioaktivnih peptida iz originalnog, „roditeljskog“ proteina. Uz to, razjašnjena struktura može pomoći farmaceutskim kompanijama da razviju moćan pripravak pri čemu će identificirana peptidna sekvenca služiti kao molekularni predložak.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Uzgojem HeLa stanica kroz 4 dana i određivanjem broja stanica dobivena je tipična krivulja rasta koja sadrži lag, log i stacionarnu fazu rasta te je pokazano da HeLa stanice imaju vrijeme udvostručenja od 18 h, uz specifičnu brzinu rasta $\mu=0,038 \text{ h}^{-1}$.
2. Najveći inhibicijski učinak na proliferaciju HeLa stanica imao je ishodni hidrolizat iz pogače konoplje pri koncentraciji proteina od 5 mg/mL pri čemu je preživljenje stanica iznosilo 29,40%.
3. Frakcija hidrolizata s peptidima manjim od 3 kDa nije pokazala inhibicijsko djelovanje na proliferaciju HeLa stanica.

7. LITERATURA

- Aluko R.E. (2017) Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. U: *Proteins in Food Processing*, 2. izd, Rickey Y. Yada, Woodhead Publishing, str. 389-412.
- Arora M. (2013) Cell Culture Media: A Review <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>> Pristupljeno 10. kolovoza 2018.
- Butler M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.
- Carpio A. (2014): The good, the bad and the HeLa <<http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/>> Pristupljeno 12. kolovoza 2018.
- Castilho L.R., Moraes A.M., Augusto E.F.P., Butler M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis, New York.
- Daliri E.B., Oh D.H., Lee B.H. (2017) Bioactive peptides. *Foods* **6**: 32-37.
- Garcia A.G.M. (2017) Hemp: A composition review plus. Završni rad, Food Science and Nutrition Department, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, SAD
- Girgih A.T., Alashi A.M., He R., Malomo S.A., Raj P., Netticadan T., Aluko R.E. (2014): A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* **6**: 5652–5665.
- Girgih A.T., He R., Malomo S., Offengenden M., Wu J., Aluko R.E. (2013) Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods* **6**: 384-394
- Girgih A.T., Udenigwe C.C., Aluko R.E. (2011) *In Vitro* Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists Society* **88**: 381-389.
- Khanal S. (2017) Animal cell culture: Introduction, Types, Methods and Applications <<https://microbeonline.com/animal-cell-culture-introduction-types-methods-applications/>> Pristupljeno 10. kolovoza 2018.
- Malomo S.A., Onuh J.O., Girgih A.T., Aluko R.E. (2015) Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients* **7**: 7616–7632.

Rabbi F. (2017) Bioactive peptides from plants: A promising area of therapeutics. Završni rad, Department of Pharmacy, BRAC University.

Vrkić A. (2017) Utjecaj ekstrakta imele na preživljavanje i morfologiju tumorskih staničnih linija HeLa i HepG2. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Yao T., Asayama Y. (2017): Animal-cell culture media: History, characteristics and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* **16**: 99-117.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Anna Mišić

ime i prezime studenta